

На правах рукописи



ГУРЬЯНОВ Иван Дмитриевич

**БИОСИНТЕЗ, ОЧИСТКА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ
ПРОДИГИОЗИНА – ПИГМЕНТА *SERRATIA MARCESCENS***

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Юсупова Дельбэр Вафовна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Рауис Госманович
(Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана, г. Казань)

доктор биологических наук, профессор
Морозов Николай Васильевич
(Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет, г. Казань)

Ведущая организация: Институт биологии УНЦ РАН, г. Уфа

Защита диссертации состоится «25» сентября 2008 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан « » августа 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. Большинство работ, в области изучения бактериальных пигментов посвящено фототрофам, в то время как пигменты нефотосинтезирующих микроорганизмов изучены в значительно меньшей степени. Ярко-красный пигмент продигиозин, синтезируемый энтеробактериями *Serratia marcescens*, представляет собой линейный трипиррол (пиррол, 3-метоксипиррол, 2-метил-3-амилпиррол). Как и многие вторичные метаболиты бактерий, продигиозин приобретает практическое значение в промышленности и медицине. В промышленности продигиозин рекомендуется в качестве красителя для полимеров, поскольку он обладает рядом преимуществ по сравнению с применяемыми в настоящее время органическими и неорганическими пигментами. Разработан способ использования продигиозина для маркирования нефтепродуктов [Гарейшина с соавт., 2003]. Пигмент хорошо растворим в различных марках топлива и легко обнаруживается по характерному спектру поглощения. Продигиозин и продигиозинподобные пигменты, синтезируемые некоторыми видами микроорганизмов, рассматриваются как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов [Montaner *et al.*, 2000; Llagostera *et al.*, 2005]. Показано, что продигиозин действует, как иммунодепрессант, селективно блокируя пролиферацию Т-клеток киллеров [Han *et al.*, 1998; Azuma *et al.*, 2000], избирательно индуцирует апоптоз различных типов злокачественных клеток [Montaner, Pérez-Tomás, 2001; Campàs *et al.*, 2003], ингибирует образование метастаз, обладает антиинвазивными свойствами [Pérez-Tomás *et al.*, 2003].

В связи с большой практической значимостью продигиозина возникает необходимость в наработке больших количеств пигмента и снижении его стоимости. Высокая стоимость пигмента тормозит, в частности, использование его в качестве маркера нефтепродуктов. Кроме того, неизученным остается вопрос о мутагенности, генетической токсичности продигиозина. Для изучения этих свойств необходимы высокоочищенные препараты продигиозина. В представленной работе предполагается разработать эффективную схему получения продигиозина и изучить некоторые биологические эффекты пигмента.

Цель и задачи исследований. Цель данной работы состояла в следующем: разработать эффективную схему получения бактериального пигмента продигиозина; определить его токсические и генотоксические свойства и установить возможности практического применения. В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- подобрать высокопродуктивные по биосинтезу пигмента продигиозина штаммы *Serratia marcescens*, оптимизировать питательную среду и условия культивирования для получения продигиозина в лабораторных и полупромышленных масштабах;
- получить и охарактеризовать высокоочищенный пигментный препарат с привлечением физико-химических методов;

- установить токсичные и безопасные концентрации продигиозина для растений, простейших и микроорганизмов;
- определить мутагенные свойства препаратов продигиозина с использованием основных методов генетической токсикологии;
- определить возможность применения пигмента в качестве фунгицидного агента для защиты растений от фитопатогенных микромицетов;
- оценить возможность и перспективность использования продигиозина в качестве биологического маркера нефтепродуктов и разработать более точный метод идентификации маркера.

Научная новизна. Проведена сравнительная оценка токсичности пигментных препаратов по отношению к прокариотическим и эукариотическим организмам. Получены приоритетные данные о генотоксических эффектах продигиозина. Показано отсутствие генотоксического воздействия очищенного продигиозина в тесте Эймса и микроядерном тесте *in vivo*. Определены антагонистические свойства продигиозина в отношении фитопатогенных микромицетов. Оценка возможности применения пигмента в качестве фунгицидного агента для защиты растений проведена с учетом определения эффективной и безопасной концентрации продигиозина.

Практическая значимость. Разработана дешевая, простая в приготовлении питательная среда для культивирования *Serratia marcescens* – штамма-продуцента продигиозина, способствующая высокому выходу пигмента. Разработан метод получения высокоочищенного пигментного препарата. С учетом использования продигиозина в различных отраслях биотехнологии (красителя полимеров, маркера нефтепродуктов) результаты, полученные в данной работе, позволяют определить возможную экологическую опасность при попадании пигмента и связанных с ним продуктов производства в окружающую среду. Выявленная фунгицидная активность продигиозина, как одно из проявлений токсического эффекта, может служить аргументом в пользу разработки методов применения данного препарата для защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенов. Упрощенный метод идентификации продигиозина и хорошая растворимость в различных марках топлива позволяют рекомендовать пигмент в качестве маркера нефтепродуктов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования. Исследования автора по тематике диссертационной работы поддержаны федеральными программами «Развитие научного потенциала высшей школы» РНП.2.1.1.1005, РНП.2.1.1.3222. Грант АН РТ, № 03-3.5-33/ 2006 (Г) 2006 г. Индивидуальный грант КГУ (2008). Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Масс-спектроскопические исследования проведены в лаборатории ИОФХ

им. Арбузова. Микроядерный тест проведен в лаборатории ИОФХ им. Арбузова.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработана эффективная схема получения продигиозина; с применением хроматографических методов получен и охарактеризован препарат продигиозина высокой степени очистки.

2. В тестах *in vitro* и *in vivo* впервые установлены особенности генотоксического влияния продигиозина, определена возможность возникновения мутаций в клетках *Salmonella typhimurium* TA 100 и индукции хромосомных повреждений эритробластов у млекопитающих.

3. Установлены антагонистическая активность штамма *Serratia marcescens* ATCC 9986 и фунгицидная активность продигиозина. Определены эффективные нетоксичные концентрации пигмента при использовании продигиозина для защиты растений.

4. Разработан и рекомендуется к применению новый способ идентификации нефтепродуктов, маркированных пигментом.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 2-й международной конференции «Наука-бизнес-образование биотехнология-биомедицина-окружающая среда» (Пушино, 2005), 10-й Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пушино, 2006), XLV международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2007), Региональной научно-практической конференции «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений» (Казань, 2007), Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2007), I международной практической конференции «Микробная биотехнология – новые подходы и решения» (Казань, 2007).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю к.б.н. Юсуповой Дельбэр Вафовне за предоставление интересной темы диссертационной работы и научное руководство. Автор также благодарит: Ключкова В.В. за проведение ЯМР-спектроскопии, Карамову Н.С. и Маргулис А.Б. за помощь в освоении методов генетической токсикологии.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 142 страницах, содержит 8 таблиц и 44 рисунка и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, включающего 163 источников, из них 133 на иностранном языке и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Оптимизацию питательных сред и определение высокоэффективных продуцентов пигмента, проводили с использованием штаммов *Serratia marcescens*, полученных из различных коллекций. Оценку антагонистической активности, проводили с использованием пигментобразующего штамма *S. marcescens* ATCC 9986 и атипичного его варианта, полученного отбором посевного материала из стабильно непигментирующих колоний. В тесте на токсичность по отношению к микроорганизмам и в тесте Эймса использовали мутантный штамм *Salmonella typhimurium* TA100 – his G46 , rfa, uvr, bio, pKM101. В качестве тест-объектов при определении антагонистического спектра, а также исследовании фунгицидной активности препаратов продигиозина использовали следующие культуры фитопатогенных грибов: *Fusarium sp.*, *Fusarium solani*, *Alternaria alternarium*, *Alternaria sambaticum* из коллекции НИЛ ББФ Казанского университета. Токсическое влияние продигиозина на рост корней и накопление биомассы растений проводили с использованием высушенных цельных семян гороха, кукурузы, ячменя и овса, предоставленных «ТатНИИСХ». Определение острой летальной токсичности проводили с использованием в качестве тест-объекта монокультуры *Paramecium caudatum*, выделенной из активного ила очистных сооружений предприятия «Казаньоргсинтез».

Условия культивирования, питательные среды. В работе использовали пептон производства Семипалатинского мясокомбината, содержащий Р_i в количестве 0.8 мг/% [Знаменская с соавт., 1982], гидролизат коллагена Щелковского биокомбината, кукурузный глютен (шрот) производства ООО «Рыбфлотпром», г. Калининград. Бактерии культивировали на жидких и агаризованных питательных средах (среда Кинга А [King *et al.*, 1954] (г/л): пептон - 20, глицерин - 10, K₂SO₄ - 10, MgCl₂ - 1.4, pH 7.6-7.9; среда Кинга А, с заменой пептона гидролизатом коллагена в количестве - 20; 10; 5.0; 2.5 г/л; пептон-глицериновая среда [Katz, 1979] (г/л): пептон - 5, глицерин - 20, pH 7.6; пептон-глицериновая среда, с заменой пептона гидролизатом коллагена в количестве 5.0; 2.5 г/л; овсяная среда [Юсупова с соавт., 1983] (г/л): пептон - 10, галактоза - 1, овсяная мука - 4, NaCl - 5, pH 7.6-7.9). В жидких средах бактерии культивировали в конических колбах (отношение объема среды к объему колбы 1:5), на качалке (200 об/мин) при температуре 28-30°C в течение 48-72 ч. Культивирование бактерий на агаризованных питательных средах проводили при одинаковых условиях с учетом размеров чашек Петри и объема сред в них. Скорость роста культуры определяли по изменению оптической плотности культуральной жидкости и веса сухой биомассы. Полученную биомассу бактерий заливали 1N раствором NaOH в

отношении 1:2 к объему питательной среды, из которой были собраны бактерии. Суспензию клеток кипятили на водяной бане в течение 1 часа. Пигмент экстрагировали 98% этанолом или подкисленным этанолом, или этанолом без предварительного добавления 1N раствора NaOH и кипячения, в соотношении 1:2 к объему среды суспензии, встряхивая на качалке при 200 об/мин. в течение 3-х часов. Повторную экстракцию проводили до полного обесцвечивания осадка. Выход продигозина пересчитывали на 1л среды или к величине сухой биомассы.

Определение количества продигозина. Количество пигмента рассчитывали с использованием удельного коэффициента поглощения, который при $\lambda = 535$ нм составляет величину $51.5 \times 10^3 \text{ см}^2/\text{мг}$ [Williams *et al.*, 1971], на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer instruments, США). Для этого полученный спиртовой экстракт пигмента разводили подкисленным этанолом (9 мл этанола + 1мл 1N HCl).

Получение продигозина и его экстракционная очистка. Для получения пигмента продигозина штамм-продуцент *S. marcescens* ATCC 9986 культивировали на агаризованной пептоно-глицериновой среде (ПГС). Экстракцию продигозина из биомассы бактерий проводили кислым этанолом (100мл 96% этилового спирта + 1мл HCl_{конц.}), до полного обесцвечивания биомассы. Полученный препарат высушивали на воздухе и повторно элюировали. Процедуру повторяли несколько раз до освобождения от нерастворимых примесей. Полученный однородный раствор был обозначен, как неочищенный пигментный препарат (НПП) и использован для маркирования нефтепродуктов (в качестве маркера).

Очистка пигментного препарата. Этанольный экстракт выпаривали в вакуумном шкафу при температуре 45-50⁰С и перерастворяли пигмент в хлороформе. Полученный раствор смешивали с равной по объему водно-этанольной смесью (объемное соотношение этанол-вода - 1:4) и эмульгировали на магнитной мешалке в течение 1ч. От водорастворимых примесей и водно-этанольной смеси освобождались на делительной воронке. Процедуру повторяли, увеличив объемное соотношение этанола вдвое. Затем пигментный препарат повторно высушивали в вакуумном шкафу и перерастворяли в этаноле.

Жидкостная хроматография. Жидкостную хроматографию проводили на стеклянной колонке общим объемом 628 см³ с использованием силикагеля марки КСК. Однородную суспензию сорбента готовили из расчета 5 г силикагеля на 20-30 мл смеси гексан – ацетон 90:10 (об/об). После наполнения колонки уровень растворителя опускали до верхней границы столбика силикагеля и дважды промывали смесью гексан – ацетон 90:30 (об/об). Раствор пигмента в этаноле наносили на поверхность сорбента. Колонку промывали следующими растворителями: 350 мл смеси гексана с ацетоном в соотношении 90:30 (об/об), 200 мл ацетона. Скорость движения подвижной фазы (растворителя) в колонке

0.03 мл/сек. Все полученные фракции были по отдельности собраны и проанализированы.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Тонкослойную хроматографию проводили на стеклянных пластинках для препаративного разделения, с силикагелем марки 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Смесь для разделения: гексан – этиловый эфир – уксусная кислота в соотношении 70:30:1 (об/об/об). Для количественной и качественной характеристики измеряли величины *R_f* полученных полос, затем их по отдельности снимали с пластин вместе с сорбентом и последовательно элюировали следующими растворителями: 96% этанол, ацетон, хлороформ.

Хроматографические полосы анализировали с использованием реактивов для определения фосфолипидов: 0.5% раствор родамина В в этаноле, реактив Драгендорфа, нингидрин, пары йода [Хроматография в тонких слоях, 1965].

Каждый этап очистки завершали анализом оптических спектров поглощения полученных фракций в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.

Физико-химические методы анализа очищенного пигмента продигозина. ЯМР спектр на ядрах ¹H записывали на ЯМР спектрометре Bruker Avance II (500 MHz), с использованием в качестве растворителя дейтерированного хлороформа (CDCl₃).

Анализ оптических спектров поглощения полученных в работе фракций продигозина проведен с использованием двулучевого спектрофотометра Lambda 35 (Perkin Elmer instruments, США) в диапазоне длин волн 200...700 нм. Масс-спектрометрию проводили на приборе ВПМС МХ-5303 (ИАП РАН, Россия).

Оценку антагонистической активности *Serratia marcescens* по отношению к фитопатогенным микромицетам проводили с использованием метода встречных культур на картофельно-глюкозном агаре (КГА).

Фунгицидная активность препаратов продигозина. Сравнение фунгицидной активности неочищенного пигментного препарата (НПП) и очищенного пигмента проводили посевом исследуемого микромицета на КГА с добавлением различных концентраций пигмента. Контролем служил рост грибов на среде без продигозина.

Методы оценки токсичности

Токсическое влияние препаратов продигозина на рост корней растений. Оценку токсического влияния продигозина на рост корней растений проводили по модифицированному методу ISO 11269-1 [ISO 11269-1, 1993].

Оценку влияния препаратов продигозина на накопление биомассы растений осуществляли с использованием метода рекомендованного Международной организацией стандартизации по протоколу ISO 1269-2 [ISO 1269-2, 1993].

Определение острой летальной токсичности на тест-объекте *Paramecium caudatum*. проводили согласно методу, разработанному на кафедре микробиологии КГУ [Наумова с соавт., 2000].

Тест на токсичность по отношению к *Salmonella typhimurium* проводили согласно [Ильинская, Маргулис, 2005].

Методы оценки генотоксичности

Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса) проводили по стандартной процедуре [Ames, Lee, 1973]. Учет результатов проводили по индукции обратных мутаций к гистидиновой прототрофности через 48ч. инкубации. Сравнивали число колоний-ревертантов в опыте и контроле.

Микроядерный тест на эритроцитах периферической крови мышей *in vivo*. Опытные концентрации продигозина (25, 8, 4 мкг/кг) вводили мышам подкожно. Образцы крови из хвостовой вены животного отбирались через 48, 72 ч после введения исследуемых концентраций. Препараты окрашивали красителем Романовского-Гимза.

Маркирование и идентификация маркированных нефтепродуктов. В работе использовали бензины различных марок, дизельное топливо производства «Татнефть», авиационный бензин и авиационный керосин, которые маркировали этанольным раствором продигозина. С целью идентификации маркированных нефтепродуктов снимали оптический спектр поглощения в области длин волн $\lambda=350\ldots 600$ нм на регистрирующем спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer instruments, США).

Статистическая обработка результатов. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе "Microsoft Excel". Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в группе не превышало 13%. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

Результаты исследования

Сравнительная характеристика роста и пигментообразования исследуемых штаммов *S. marcescens*. Среди 22-х изученных представителей вида *S. marcescens* наибольшие количества продигозина образовывали два штамма *S. marcescens* ATCC 9986 и *S. marcescens* ВКМБ-851, которые были отобраны для дальнейших исследований. Остальные пигментообразующие штаммы синтезировали незначительные количества продигозина. Результаты проведенной работы позволяют рекомендовать штаммы *S. marcescens* ATCC 9986 и *S. marcescens* ВКМБ-851 в качестве перспективных продуцентов продигозина.

Образование продигозина при культивировании бактерий на различных средах. Рост и пигментообразование отобранных штаммов изучали на трех средах, рекомендованных ранее для получения продигозина: среда Кинга А, пептон-глицериновая и овсяная.

Наибольшее накопление биомассы происходило на среде Кинга А. При этом штамм *S. marcescens* ВКМБ-851 отличался более интенсивным ростом. Штамм *S. marcescens* ATCC 9986 менее интенсивно накапливал биомассу на среде Кинга А, но синтезировал значительно большее количество пигмента. На среде Кинга А биосинтез продигиозина штаммом *S. marcescens* ATCC 9986 был в четыре раза выше чем на пептон-глицериновой среде (рис. 1).



Рис. 1 Сравнительная характеристика роста и пигментообразования штаммов *S. marcescens* ATCC 9986 и ВКМБ-851 на питательных средах: 1 – среда Кинга А, 2 – пептон-глицериновая (ПГС), 3 – овсяная среда; А – биомасса; Б – пигмент; В – продуктивность.

В связи с высокой стоимостью данных питательных сред была предпринята попытка заменить в них пептон на гидролизат коллагена или кукурузный шрот. Замена пептона на гидролизат коллагена в среде Кинга А приводило к стимуляции роста обоих штаммов. При этом у штамма *S. marcescens* ВКМБ-851 общий выход пигмента увеличивался в 8 раз, достигая своего наибольшего значения при концентрации гидролизата коллагена 5 г/л (рис.2). Аналогично увеличивалось накопление биомассы. Модификация пептон-глицериновой среды путем замены пептона на гидролизат коллагена (5 г/л) стимулировала рост штаммов, увеличивала общий выход продигиозина, и увеличивала продуктивность штамма *S. marcescens* ВКМБ-851. Продуктивность штамма *S. marcescens* ATCC 9986 не увеличивалась. При использовании кукурузного шрота наблюдался слабый рост бактерий, пигментообразование отсутствовало.

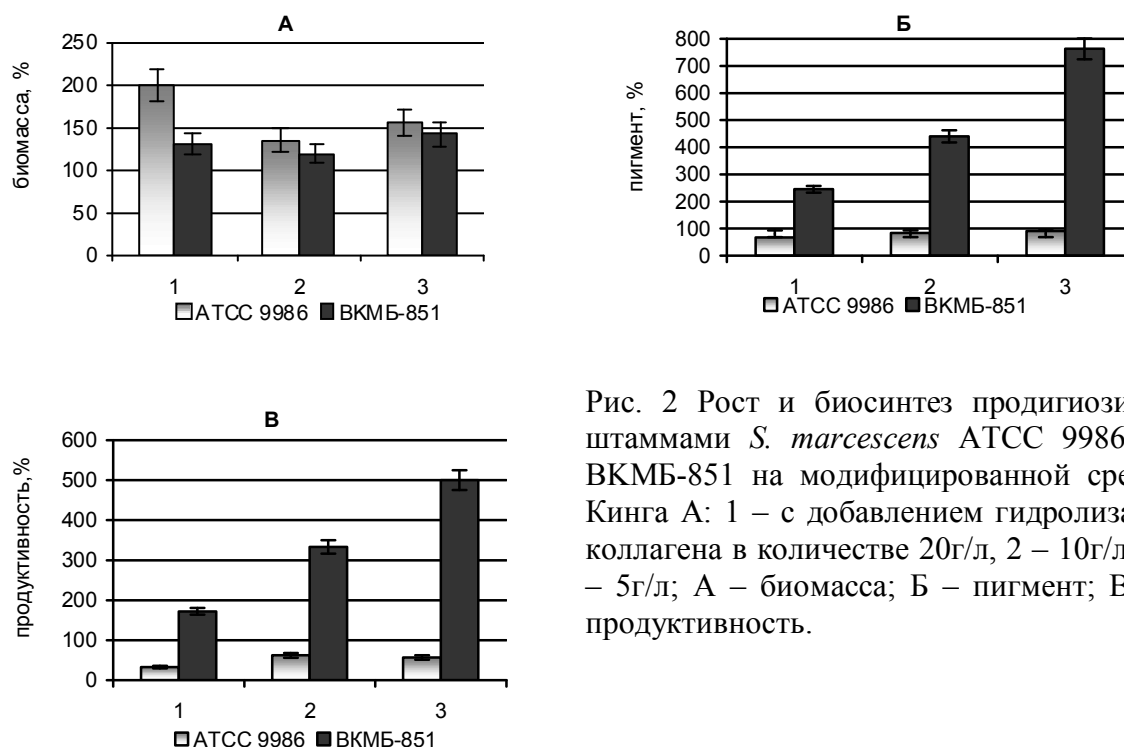


Рис. 2 Рост и биосинтез продигиозина штаммами *S. marcescens* ATCC 9986 и ВКМБ-851 на модифицированной среде Кинга А: 1 – с добавлением гидролизата коллагена в количестве 20г/л, 2 – 10г/л, 3 – 5г/л; А – биомасса; Б – пигмент; В – продуктивность.

Оптимальными условиями для биосинтеза продигиозина отобранными штаммами на модифицированной среде Кинга А были следующие: продолжительность культивирования – 48 ч, количество инокулята – 2% от объема среды, температура - $28 \pm 0.2^\circ\text{C}$, аэробные условия. Продигиозин не выделяется в среду и локализован в поверхностных структурах клетки. С целью подбора менее трудоемкого и более эффективного метода экстракции пигмента из клеток сравнивали различные методы экстракции (табл. 1). Наиболее результативным оказался метод экстракции пигмента из клеток этанолом без предварительной обработки клеток щелочью.

Таблица 1.
Влияние метода экстракции пигмента из клеток на выход продигиозина

№	метод экстракции	биомасса, г	пигмент, мкг	%
1	Разрушение клеток кипячением с NaOH, с последующей экстракцией пигмента этанолом	4.4	189	100
2	Экстракция пигмента этанолом без предварительной обработки клеток	4.4	259	156±7
3	Экстракция пигмента подкисленным этанолом без предварительной обработки клеток	4.4	240	147±6
4	Экстракция пигмента изопропанолом без предварительной обработки клеток	4.4	240	147±6

Выделение и очистка пигментного препарата продигиозина, его характеристика. Неочищенный пигментный препарат (НПП) в подкисленном этаноле имел типичный для продигиозина спектр поглощения в видимой области в кислых и щелочных условиях (рис. 4).

Рис. 4. Оптические спектры поглощения неочищенного пигментного препарата в этаноле: А – при рН 3.0, Б – при рН 9.0.

На колонке с силикагелем пигмент делился на три основные фракции: желто-оранжевую, красную и сиреневую, спектры поглощения которых представлены на рисунке (рис.5).

Рис. 5. Оптические спектры поглощения фракций, полученных при хроматографии неочищенного пигментного препарата на колонке: 1 - желто-оранжевой, 2 - красной (с максимумом поглощения 535 нм и плечом 485 – 515 нм), 3 - сиреневой (с максимумом поглощения 488-500 нм).

Для проведения дальнейшей очистки с использованием ТСХ была отобрана красная фракция, которая на пластинках с силикагелем также разделялась на три вышеуказанные фракции с описанными характеристиками (сиреневая - $R_f = 0.058$, красная - $R_f = 0.312$, желто-оранжевая - $R_f = 0.824$). Таким образом, выход интересующей нас красной

фракции пигмента в процентном соотношении от используемого в процессе очистки пигментного препарата составил величину – 7.6% (табл. 2).

Таблица 2
Выделение и очистка препарата продигиозина

Этапы очистки	Количество продигиозина, мг/л	Выход, %
Этанольный экстракт	0.64	100
Колоночная хроматография	0.22	34.2
Тонкослойная хроматография	0.05	7.6

Красная фракция пигмента была отобрана как наиболее соответствующая нативному пигменту продигиозину и проанализирована с использованием методов ТСХ, масс-спектрометрии и ЯМР-спектрометрии (рис. 6, 7), что позволило подтвердить принадлежность данной фракции к продигиозину и детектировать её чистоту.

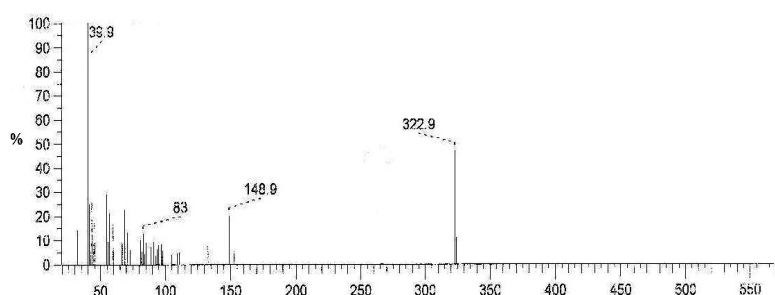


Рис. 6. Масс-спектр красной фракции пигмента (M_r полученной фракции 322,9 Da).

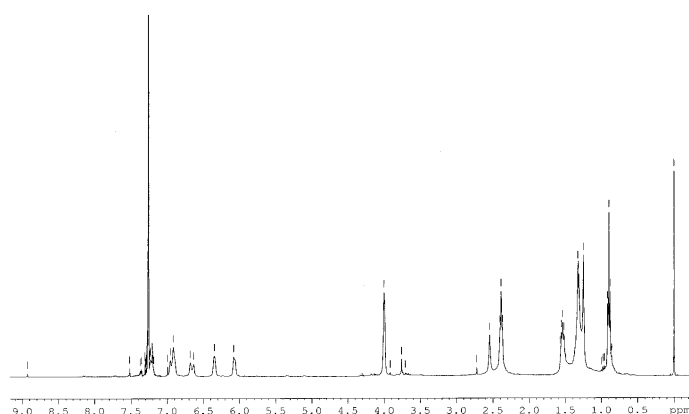


Рис. 7. ЯМР-спектр очищенного пигментного препарата. ЯМР-химические сдвиги продигиозина были следующими: 0.92 p.p.m., 1.31 p.p.m., 1.33 p.p.m., 1.60 p.p.m., 2.40 p.p.m., 2.55 p.p.m., 4.00 p.p.m., 6.08 p.p.m., 6.35 p.p.m., 6.68 p.p.m., 6.99 p.p.m., 7.27 p.p.m., 7.55 p.p.m.

Проявление хроматографических пластинок после опрыскивания раствором нингидрина, реактивом Драгендорфа, раствором родамина В и экспозиции в йодной камере показало общее наличие фосфатидов и, в

частности, аминокислот в НПП и их отсутствие в пигментном образце, прошедшем все этапы очистки.

Продигиозин, как фактор антагонистической активности *S. marcescens*. При посеве методом встречных культур *A. sambaticum* и *S. marcescens* ATCC 9986, *Fusarium solani* и *S. marcescens* ATCC 9986 выявлено значительное ингибирование роста фитопатогенного микромицета с ярко выраженной зоной лизиса (рис. 8). Факторы фунгицидной активности *S. marcescens* ATCC 9986 не влияли на рост колонии *Fusarium sp.* Штамм *S. marcescens* 24 (апигментный) не проявлял антагонистическую активность в отношении микромицетов, используемых в опыте.

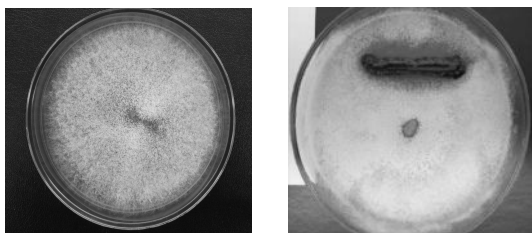


Рис. 8. Антагонистическая активность *S. marcescens* ATCC 9986 по отношению к *F. solani*: А – контроль - рост *F. solani*, Б – совместное культивирование *F. solani* с пигментобразующим штаммом *S. marcescens* ATCC 9986.

Добавление в питательную среду НПП или очищенного пигмента продигиозина в ряду концентраций 0.1, 0.5, 1.0 мкг/мл приводило к ингибированию роста патогенных микромицетов (рис.9).

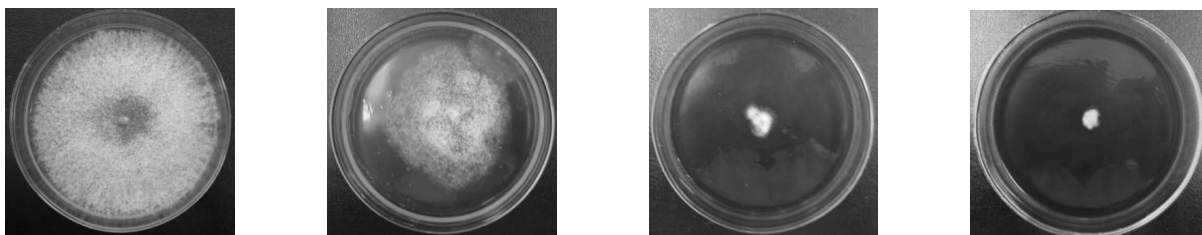


Рис.9. Фунгицидное действие очищенного пигментного препарата по отношению к *Fusarium sp.* А – контроль (рост колонии *Fusarium sp.* на КГА), Б – рост колонии *Fusarium sp.* на среде с концентрацией продигиозина 0.1мкг/мл, В – 0.5мкг/мл, Г - 1мкг/мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что фактором антагонистической активности *S. marcescens* является продигиозин.

Токсическое воздействие препаратов продигиозина на прорастание семян и накопление биомассы растений. Результаты работы по установлению токсического влияния НПП и очищенного пигмента продигиозина на прорастание семян растений представлены в таблице (табл. 3).

Таблица 3

Токсическое влияние продигиозина на прорастание семян

Концентрация, мкг/мл	ингибирование роста корней, %			
	кукуруза		горох	
	неочищенный пигментный препарат	очищенный пигмент	неочищенный пигментный препарат	очищенный пигмент
2	98.6±1.6	100	94.0±2.0	98.2±1.5
1	97.5±2.0	100	93.0±3.0	96.0±3.4
0,5	82.0±3.3	94.0±1.8	75.0±3.5	88.0±3.0
0,2	13.0±2.8	21.5±3.1	11.7±2.4	16.0±3.17
0,1	4.2±2.0	8.0±2.3	3.6±1.1	5.7±1.8

Характерно, что очистка продигиозина приводит к возрастанию его токсического воздействия на прорастание корней растений. Эти результаты косвенно подтверждаются особенностями токсического влияния препаратов продигиозина на способность растений накапливать биомассу (рис. 10).

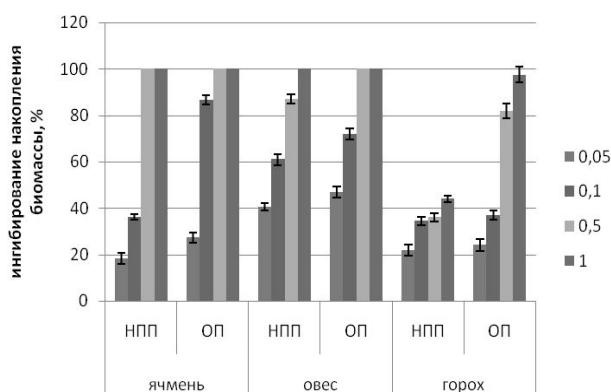


Рис. 10. Ингибирование (% от контроля) накопления биомассы растением при суточной экспозиции семян в растворе с различной концентрацией пигмента (0.05, 0.1, 0.5, 1 мкг/мл)

Определение острой летальной токсичности на тест-объекте *Paramecium caudatum*. Наиболее токсичным оказался неочищенный пигментный препарат, который уже при концентрации 0.009 мкг/мл вызывал 50% гибель инфузорий, а в концентрации 0.046 мкг/мл данное соединение вызывало гибель 90-100% особей тест-объекта. Наименее токсичным оказался очищенный пигментный препарат, LD₅₀ которого установлена для концентрации 0.05 мкг/мл (табл. 4).

Таблица 4.

Смертность *Paramecium caudatum* (% от контроля) при действии неочищенного пигментного препарата (НПП) и очищенного продигиозина (ОП)

концентрация, мкг/мл	смертность, %	
	НПП	ОП
0	0	0
0.01	56.5±3.4	18.0±1.6
0.05	100	49.5±2.7
0.1	100	100

Токсические эффекты продигиозина по отношению к бактериям. Токсический эффект определяли по выживанию тестерного штамма *S.typhimurium* TA100 в опытных вариантах по сравнению с контрольным. Продигиозин обладал сильным токсическим действием по отношению к тестерному штамму в концентрациях 1 мкг/мл и выше. Эти данные были учтены при изучении генотоксичности пигментных препаратов.

Индукция генных мутаций пигментными препаратами в тесте Эймса. Результаты исследования мутагенной активности пигментного препарата на штамме *S.typhimurium* TA100 без метаболической активации представлены на рисунках (рис. 11, 12).

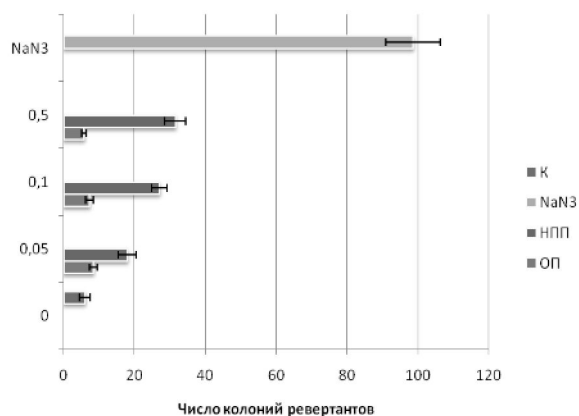


Рис. 11. Мутагенное действие различных концентраций (0.05, 0.1, 0.5 мкг/мл) НПП и ОП в тесте Эймса без метаболической активации. К — негативный контроль (количество колоний ревертантов при спонтанной реверсии), NaN₃ - позитивный контроль (количество колоний ревертантов на среде с добавлением азида Na в концентрации 10 мкг/чашку).

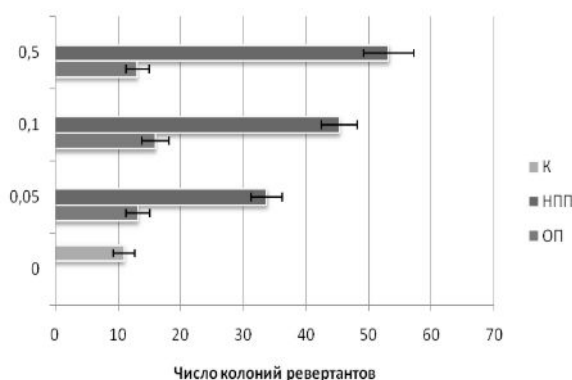


Рис. 12. Мутагенное действие различных концентраций (0.05, 0.1, 0.5 мкг/мл) НПП и ОП в тесте Эймса с метаболической активацией. К – негативный контроль (количество колоний ревертантов при спонтанной реверсий).

Мутагенность оценивали по превышению количества ревертантов в опыте над контролем. Для НПП в тесте Эймса без метаболической активации это превышение составило 5.25 раз при концентрации 0.5мкг/мл, 4.5 и 3.0 раза в концентрациях 0.1 и 0.05 мкг/мл соответственно. В варианте опыта с метаболической активацией количество ревертантов на среде с 0.5 мкг/мл НПП снизилось до 4.8 раз по сравнению с контролем, в 4.12 и 3.1 раза в концентрациях 0.1 и 0.05 мкг/мл.

Таким образом, тест Эймса показал слабую мутагенную активность неочищенного пигментного препарата продигиозина в ряду концентраций 0.5 – 0.1 – 0.05 мкг/мл. Очищенный продигиозин не проявил мутагенной активности во всех вариантах опыта.

Микроядерный тест на эритроцитах периферической крови мышей *in vivo*. Анализ 1350 нормохромных эритроцитов (НХЭ) в контрольных образцах препаратов крови мышей, и опытных вариантах с различными концентрациями очищенного продигиозина проводился с целью установления отношения НХЭ к полихромным эритроцитам (ПХЭ), которое отражает уровень хромосомных повреждений и генотоксический потенциал исследуемых соединений. Частота встречаемости ПХЭ в контрольном образце, на 48 час проведения опыта, была равна 4-8, что несколько выше данных литературы. Отбор пробы контрольного образца еще через 24 часа, показал идентичные результаты – количество микроядер в периферической крови мышей не увеличилось. Результаты анализа влияния опытных концентраций очищенного продигиозина на частоту образования ПХЭ представлены в таблице (табл. 5).

Таблица 5

Влияние продигиозина на частоту образования ПХЭ в периферической крови мышей

концентрация, мкг/кг веса животного	количество ПХЭ	
	48ч.	72ч.
0 (негатив. контроль)	5.8±1.9	5.6±2.1
4	6.7±2.3	6.6±1.5
8	6.3±1.7	7.3±1.7
25	5.0±1.2	3.6±1.5
1.5 (колхицин)	15.4±1.1	22.3±0.9

Таким образом, проведённое изучение генотоксичности продигиозина с использованием микроядерного теста показало незначительную индукцию микроядер в ПХЭ у обработанных животных и отсутствие дозозависимого эффекта во всех используемых концентрациях. Очищенный продигиозин в изученных концентрациях не является позитивным индуктором микроядер и не обладает существенным генотоксическим эффектом *in vivo*.

Маркирование нефтепродуктов продигиозином и способ идентификации маркированных нефтепродуктов.

Нами разработан способ идентификации маркированного нефтепродукта, основанный не на измерении поглощения нефтепродукта только в одной точке, при длине волны $\lambda = 535 \text{ nm}$, а на снятии всего оптического спектра маркированного бензина в области длин волн $\lambda = 300\text{-}600 \text{ nm}$, без добавления проявителя. Немаркированный нефтепродукт при аналогичных условиях исследования демонстрирует отсутствие спектра поглощения в данной области (рис. 13). Предлагаемый нами способ идентификации делает возможным идентификацию маркированного нефтепродукта в условиях потока вещества.

АБ

Рис. 13. Спектр бензина АИ 92: А - немаркированного бензина, Б – маркированного; контроль немаркированный бензин.

Спектры маркированных бензинов А 76, АИ 95, АИ98 и дизельного топлива производства «Татнефть», авиационный бензина и авиационный керосина аналогичны спектру АИ 92. Во всех маркированных образцах бензинов и керосина в области длин волн $\lambda = 300\text{-}600 \text{ nm}$ наблюдается ярко выраженный пик, характерный для спектра пигмента.

Хранение в течение 6 месяцев не оказывало существенного влияния на маркированные бензины.

Обсуждение результатов

Эффективность биотехнологического производства, связанного с использованием микроорганизмов в первую очередь определяется правильным подбором штаммов-продуцентов продуктов производства, а также оптимальностью условий биосинтеза. Кроме того, важным критерием является сравнительная дешевизна сырья для приготовления питательной среды. Решающее значение для жизнедеятельности продуцентов имеют набор и соотношение компонентов среды культивирования (качество сырья, отношение C:N, содержание примесей). *S. marcescens* является прототрофным организмом и может расти на средах с единственным органическим источником углерода. Для получения пигмента *S. marcescens* в литературе предложены разнообразные среды [King *et al.*, 1954; Williams *et al.*, 1961, 1971; Трутко, Акименко, 1989; Kats, Sobleski, 1979; Chang *et al.*, 2000; Giri *et al.*, 2004]. На сегодняшний день относительно дешевой и экономически выгодной является пептон-глицериновая среда, содержащая всего 5г пептона и 20г глицерина на 1 л. Однако поиски высокопродуктивных штаммов и дешевых питательных сред проводятся широким фронтом и в настоящее время [Chang *et al.*, 2000; Giri *et al.*, 2004; Тао *et al.*, 2005; Oller, 2006]. Направление исследований перспективно и может снизить стоимость препарата. Большинство рекомендуемых сред содержит дорогостоящий пептон, который необходимо заменить каким-либо более дешевым аналогом, способным обеспечить соизмеримый биосинтез продигиозина.

Разработанная питательная среда (модифицированная среда Кинга А, в которой пептон (20 г/л) заменен гидролизатом коллагена в концентрации 5 г/л), обеспечивает хороший рост и высокий выход пигмента при использовании рекомендуемых штаммов-продуцентов (*S. marcescens* ATCC 9986 и ВКМБ-851). Использование штамма *S. marcescens* ATCC 9986 и модифицированной питательной среды (5 г/л гидролизата коллагена), удешевляет получение продигиозина в 5 раз. Мы предполагаем, что отношение источника азота к источнику углерода 2:1 (в среде Кинга А) не оптимально для роста и синтеза продигиозина *S. marcescens*. По мере уменьшения концентрации гидролизата коллагена в среде достигается соотношение источника азота и углерода, равное 1:2, что более благоприятно для биосинтеза продигиозина.

Очистка продигиозина – органического вещества природного происхождения – сложная задача, так как бактериальный пигментный препарат является, по сути, пигментным комплексом, состоящим из множества фракций, кроме того, используемый способ выделения пигмента из бактериальной биомассы не исключает возможности

одновременного извлечения из клеток и других соединений, в особенности соединений липидной природы. Известно, что пигмент связан с клеточной оболочкой, содержится в периплазматическом пространстве и/или на поверхности цитоплазматической мембраны [Vinas *et al.*, 1983; Matsuyama *et al.*, 1986], а, значит, может быть связан с некоторыми компонентами клеточной стенки. Поэтому приоритетной задачей при очистке пигмента было освобождение пигментного раствора от липидов и сопутствующих примесей. Необходимо учитывать нестабильную природу пигмента и подобрать наиболее щадящий метод очистки, приводящий к разделению пигментного препарата на минимальное количество основных фракций. Сложность применения высокотехнологичных методов очистки с жесткими условиями по отношению к продигиозину заключается в том, что этот вторичный метаболит чрезвычайно нестабилен даже в высокоочищенном состоянии и при хранении продолжает разделяться с появлением множества минорных фракций, которые обнаруживаются при рехроматографии уже очищенного пигмента [Walter *et al.*, 1972]. Степень чистоты полученного нами в процессе очистки пигмента продигиозина анализировали с использованием метода ЯМР. Особые преимущества этого метода заключаются в том, что он позволяет однозначно определить число и расположение индивидуальных атомов в молекуле исследуемого вещества. Анализ ЯМР спектров пигмента продигиозина, молекулярная масса которого 323 Да достаточно прост, что объясняется небольшим количеством спектральных линий, вследствие небольшой его молекулярной массы. Общий анализ записанного спектра ЯМР позволяет сделать положительные выводы о чистоте полученного пигментного образца. Таким образом, разработанный способ очистки пигментного препарата позволяет достичь поставленной цели при незначительных материальных затратах и может быть использован для дальнейшей работы с пигментом продигиозином в лабораторных исследованиях.

Потенциальную экологическую и токсикологическую опасность пигмента необходимо установить для безопасного использования его в различных отраслях биотехнологии, медицине, сельском хозяйстве. Обработка растений бактериальной суспензией *S. marcescens* эффективна против таких возбудителей заболеваний, как *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* [Someya *et al.*, 2003; Someya *et al.*, 2005]. Однако, факторы антагонистической активности *S. marcescens* изучены недостаточно. Предполагается, что таковыми являются ярко-красный пигмент продигиозин синтезируемый *S. marcescens* и комплекс хитинолитических ферментов секретируемых бактериями в среду. В некоторых работах отмечается, что продигиозин способен оказывать фунгицидное воздействие, которое наиболее явно проявляется лишь в присутствии хитинолитического комплекса ферментов. Конкурентное взаимодействие 2-х штаммов *S. marcescens* ATCC 9986 (пигментобразующий) и *S. marcescens* 24 (апигментный) с фитопатогенными микромицетами,

показало возможность использования пигментобразующего штамма в качестве фунгицидного агента для защиты растений и сформировало представление о роли пигмента продигиозина, как основного фактора антагонистической активности продуцента. Анализ фунгицидной активности неочищенного пигментного препарата и очищенного пигмента позволил установить пропорциональную зависимость угнетения роста колоний фитопатогенных микромицетов от концентрации продигиозина. Возможность использования продигиозина *S. marcescens* в качестве нового фунгицидного агента должна рассматриваться с позиции безопасности его применения для сельскохозяйственных культур и условий окружающей среды. Мы установили, что эффективные концентрации продигиозина, как фитопротекторного вещества, находятся в диапазоне от 0.05 до 0.3 мкг/мл. В то же время авторы, предлагающие использовать продигиозин в качестве фунгицидного агента, указывают эффективные концентрации пигмента в пределах 1-100 мкг/мл [Someya *et al.*, 1997; Someya *et al.*, 2001]. Однако, применение пигмента для защиты растений, в указанных концентрациях не оправдано вследствие ингибирования продигиозином роста корней и способности растений накапливать биомассу, что показано в нашей работе.

Основными задачами данной работы были установление и изучение возможных токсических и генотоксических эффектов пигмента продигиозина. Цитотоксическое действие продигиозина установлено многими исследователями, при изучении противоопухолевого действия пигмента, на линиях раковых клеток [Montaner *et al.*, 2000; Llagostera *et al.*, 2005], при изучении фунгицидного потенциала продуцента *Serratia marcescens* [Someya *et al.*, 2003; Someya *et al.*, 2005]. Одним из современных и высокочувствительных методов изучения токсичности даже при очень низкой концентрации исследуемых веществ является тест на *Paramecium caudatum*. Результаты нашей работы подтверждают высокую чувствительность простейших к цитотоксическому действию продигиозина и сопоставимы с данными литературы, в которых также отмечается возможность применения этого пигмента для лечения протозойных инфекции [Melo *et al.*, 2000]. Такие свойства пигмента могут объяснять его цитотоксическое действие в отношении бактерий и позволяют предполагать наличие у продигиозина генотоксического потенциала. Исследование мутагенной активности пигментного препарата на тестерном штамме *S. typhimurium* TA100 проводили в диапазоне концентраций 0.005 - 0.5 мкг/мл, что объясняется результатами предварительного изучения токсичности препаратов продигиозина. Неочищенный пигментный препарат в используемом диапазоне концентраций индуцирует генные мутации типа замены пар оснований в клетках *S. typhimurium* TA100. Обнаруженный эффект носит дозозависимый характер, однако он незначителен и свидетельствует о слабой мутагенной активности соединения [Фонштейн с соавт., 1985]. Очистка пигментного препарата снижает описанный мутагенный эффект

до уровня фоновой частоты реверсий в негативном контроле. Таким образом, проявляемый генотоксический потенциал неочищенного пигментного препарата может быть связан с загрязняющими его компонентами, способными вызывать реверсию микроорганизмов опытного штамма к прототрофности. Метаболическая активация пигментных препаратов при использовании фракции S9 не способствует возникновению мутагенного эффекта в тесте Эймса. Возможно, что система монооксигеназ фракции S9 не способна трансформировать такое соединение как продигиозин, либо интермедиаты, образующиеся при его метаболизме не отличаются по степени своей генотоксичности от исходного соединения.

Наиболее распространенным методом изучения генотоксического потенциала соединений *in vivo* является учет микроядер в полихромных эритроцитах периферической крови мышей. Результаты изучения генотоксического потенциала продигиозина, представленные в данной работе, основываются на анализе 1350 НХЭ в контрольных образцах препаратов крови мышей, и опытных вариантах с различными концентрациями очищенного пигмента. Проведённое изучение генотоксичности продигиозина с использованием микроядерного теста показало незначительную индукцию микроядер в ПХЭ у обработанных животных. При этом дозозависимый эффект во всех используемых концентрациях отсутствовал. Таким образом, очищенный продигиозин в изученных концентрациях не является позитивным индуктором микроядер и не обладает существенным генотоксическим эффектом *in vitro*.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Serratia marcescens* ATCC 9986 и ВКМБ-851 являются перспективными продуцентами продигиозина. Модифицированная среда Кинга А рекомендуется для получения продигиозина при использовании в качестве продуцентов штаммов *Serratia marcescens* ATCC 9986 и ВКМБ-851.
2. Применяемый в работе метод очистки пигментного препарата позволяет получить высокоочищенный продигиозин, что подтверждено методами тонкослойной хроматографии, ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии.
3. Продигиозин (0.1мкг/мл - 2мкг/мл) оказывает существенное токсическое воздействие на растения, выражающееся в ингибировании прорастания корней и накопления биомассы; на тестерный штамм *Paramecium caudatum* и фитопатогенные микромицеты родов *Fusarium* и *Alternaria*. Очистка продигиозина приводит к усилению его фунгицидного эффекта и фитотоксичности, но снижает токсический потенциал по отношению к простейшим.

4. Результаты изучения генотоксичности очищенного продигиозина в тесте Эймса и микроядерном тесте на эритроцитах мышей позволяют причислить продигиозин к веществам с незначительной мутагенной активностью.
5. Возможно использование продигиозина в качестве фунгицидного агента для защиты растений от фитопатогенных микромицетов в концентрациях от 0.05 мкг/мл до 0.1 мкг/мл, не оказывающих фитотоксическое воздействие.
6. Препарат продигиозина может быть использован для маркирования различных нефтепродуктов, где его содержание определяется по интенсивности характерных спектральных линий в области длин волн $\lambda=300\ldots600\text{нм}$ при рН ниже 7, в отсутствие проявляющих реактивов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Гурьянов И.Д.** Токсикологические эффекты продигиозина / И.Д. Гурьянов, Д.В. Юсупова // Ученые записки Казанского государственного университета. Сер. Естественные науки. – 2008. – Т.150, Кн. 2. – С. 120-125.
2. **Гурьянов И.Д.** Очистка и характеристика пигментного препарата продигиозина / И.Д. Гурьянов, Д.В. Юсупова, В.В. Ключков, А.Р. Юльметов // Естественные и технические науки. – 2008. – №3 – С. 64-65.
3. **Гурьянов И.Д.** Фитотоксические свойства продигиозина *Serratia marcescens* / И.Д. Гурьянов, Д.В. Юсупова // Защита и карантин растений. – 2008. – №4 – С. 58
4. **Гурьянов И.Д.,** Науменко Е.А. Токсикологические эффекты продигиозина *Serratia marcescens* / Казанск. гос. ун-т. – Казань, - 2007. – 9 с. – Деп. в ВИНТИ 11.01.07, № 27.
5. Юсупова Д.В. Способ идентификации маркированных нефтепродуктов / Д.В. Юсупова, Л.А. Габдрахманова, М.А. Куркина, **И.Д. Гурьянов** // Заявка на патент С10L1/00, С10M159/02, С10N30:20, Заявка № 2007135940/04(039293), с приоритетом от 27.09.07.
6. Юсупова Д.В. Способ получения пигмента / Д.В. Юсупова, Л.А. Габдрахманова, **И.Д. Гурьянов**, М.А. Куркина, А.И. Албулов, М. А. Фролова, И.Г. Ермишина // Заявка на патент С10M159/02, С12 N 1/20 , Заявка № 2007138501/13(042117), с приоритетом от 08.10.07.
7. Рязанцева И.Н. Бактериальные пигменты в биотехнологии / И.Н. Рязанцева, И.Н. Андреева, Ч.Б. Медведева, Т.И. Огородникова, Н.Н. Валиева, **И.Д. Гурьянов** // Тез. докл. 2-я международная конференция «Наука-бизнес-образование биотехнология-биомедицина-окружающая среда». – Пущино, – 2005. – С.42.
8. Иванчина Ю.В. Подбор условий оптимальных для биосинтеза пигмента продигиозина энтеробактериями *Serratia marcescens* / Ю.В. Иванчина, М.А. Куркина, **И.Д. Гурьянов** // Тез. докл. 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». –

Пушино, – 2006. – С.372.

9. **Гурьянов И.Д.** Оптимизация питательных сред для получения пигмента продигиозина *Serratia marcescens* / И.Д.Гурьянов, М.А. Куркина // Тез. докл. XLV международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Новосибирск, – 2007. – С.109-111.

10. **Гурьянов И.Д.** Токсические и мутагенные эффекты бактериального пигмента продигиозина / И.Д.Гурьянов, Д.В Юсупова // Тез. докл. региональной научно-практической конференции «Синтез и перспективы использования новых биологически активных соединений». – Казань, – 2007. – С.73-75.

11. Куркина М.А. Разработка эффективной биотехнологии получения бактериального пигмента продигиозина / М.А.Куркина, **И.Д. Гурьянов**, Д.В. Юсупова // Тез. докл. VII научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ «Материалы и технологии XXI века». – Казань, – 2007. – С.67.